

# 体外培养组织工程皮肤几种活性肽及细胞外基质的表达

肖仕初 夏照帆 杨珺 刘志国 贲道锋 俞为荣 杨勇 朱世辉

**【摘要】 目的** 观察体外培养组织工程皮肤的生物学活性。**方法** 将表皮细胞和(或)成纤维细胞种植于脱细胞真皮表面,经培养后形成各种皮肤替代物,分别于接种后 3、7 d 时收集培养上清,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定白细胞介素(IL)-6、IL-8 和转化型生长因子  $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 的含量,采用放射免疫法测定层粘连蛋白、透明质酸、I 型和 III 型胶原的含量。**结果** 各皮肤替代物上清中均可检测到一定量的细胞因子、生长因子和细胞外基质成分,培养 7 d 与 3 d 时相比,除 TGF- $\beta_1$  外,其余各指标的含量均明显上升( $P < 0.01$ )。含表皮细胞和成纤维细胞的皮肤替代物与单纯含成纤维细胞的皮肤替代物相比,培养上清中 I、III 型胶原含量明显减少( $P < 0.01$ )。**结论** 体外培养的皮肤替代物具有较强的生物学活性,种植表皮细胞对成纤维细胞的功能具有一定的调节作用。

**【关键词】** 表皮细胞; 成纤维细胞; 细胞外基质; 活性肽; 脱细胞真皮基质

Expression of some active peptides and extracellular matrix in the in vitro cultured tissue engineering skin  
XIAO Shi-chu, XIA Zhao-fan, YANG Jun, LIU Zhi-guo, BEN Dao-feng, YU Wei-rong, YANG Yong, ZHU Shi-hui. Department of Burn Surgery, Changhai Hospital, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, P. R. China

**【Abstract】 Objective** To investigate the bioactivity in the in vitro cultured tissue engineering skin.

**Methods** Epithelial cells and fibroblasts were seeded onto the surface of an acellular dermal matrix to form a skin substitute, and the culture supernatants were collected on the 3rd and the 7th day. The changes in the content of interleukin-6 and interleukin-8 (IL-6,8) and transforming growth factor I (TGF- $\beta_1$ ) in the supernatants were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), while the changes in the content of laminin, hyaluronic acid, type I and type III collagen were quantified by radioactive immunoassay (RIA). **Results** A certain amounts of cytokines, growth factors and extracellular matrix could be detected in the supernatant of the skin substitute, and the contents of these substances on the 7th day were significantly higher than those on the 3rd day ( $P < 0.01$ ). The contents of type I and type III collagen in the skin substitute containing both epidermis and fibroblast were dramatically lower compared with those in the skin substitute only containing fibroblast ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The in vitro cultured skin substitute possessed relatively powerful bioactivity, and the fibroblast function could be modulated to some extent by seeding epidermis on it.

**【Key words】** Epidermis; Fibroblast; Extracellular matrix; Active peptide; Acellular dermal matrix

组织工程皮肤的构建与移植已成为烧伤医学研究的热点。对于体外培养的皮肤替代物的生物学活性,目前尚缺乏有效的方法进行评价<sup>[1]</sup>。本研究以异种(猪)脱细胞真皮基质(acellular dermal matrix, ADM)为载体,构建含表皮细胞层及(或)成纤维细胞层的皮肤替代物,测定其在体外培养条件下几种活性肽及细胞外基质成分的表达,从而观察其基本

生物学活性。

## 材 料 与 方 法

1. 分组:实验分为单纯表皮细胞(human keratinocyte, HK)组、单纯成纤维细胞(human fibroblast, HF)组、表皮细胞-ADM (HK-ADM)组、表皮细胞-ADM-成纤维细胞(HK-ADM-HF)组、ADM-成纤维细胞(ADM-HF)组。

2. 皮肤替代物的体外构建:参照文献[2,3]进行,制备 ADM 后保存于 4℃ 待用。HK-ADM 的构建:在 ADM 表皮面接种 HK ( $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ ),按常规进行体外培养,每 2~3 d 换液 1 次。HK-ADM-HF 的构建:在 ADM 真皮面接种 HF ( $2 \times 10^5/\text{cm}^2$ ),常规培养。2 d 后,翻转 ADM 使表皮面朝上,接种 HK ( $5 \times 10^5/\text{cm}^2$ ),继续培养。ADM-HF 的构建:在 ADM

基金项目:国家杰出人才科学基金资助项目(39725029);国家重点基础研究发展规划资助项目(G1999054309);国家高新技术研究发展计划资助项目(2001AA216041);上海市卫生系统百名跨世纪优秀学科带头人培养计划资助项目(97BR046)

作者单位:200433 上海,第二军医大学长海医院全军烧伤中心

通讯作者:夏照帆(电话:021-25070599, E-mail: xiazhaoan@

hotmail.com)200433 上海,第二军医大学长海医院全军烧伤中心

真皮面接种 HF( $2 \times 10^5/cm^2$ ), 常规培养。

3. 形态学观察: 接种后, 对各皮肤替代物定期取组织切片, 行常规组织学及扫描电镜观察, 以 HK 组或 HF 组作为对照。

4. 培养上清中各项指标的测定: 分别于接种后 3、7 d 时, 吸取各培养物的培养上清, 置  $-20^\circ C$  保存待测。(1) 培养上清中白细胞介素(IL)-6、IL-8 和转化型生长因子  $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ ) 的测定: 按酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(美国 Genzyme 公司)说明书操作。采用美国 Bio-rad 公司生产的酶标仪, 于波长 450 nm 处测定各样品吸光度(A)值, 根据标准曲线换算成相应浓度。(2) 培养上清中 I、III 型胶原、层粘连蛋白、透明质酸含量的测定: 采用放射免疫分析测定试剂盒(海军医学研究所生物技术中心)进行测定。用 Mini-monitor 型放射性检测仪(英国 Morgan 公司)测定沉淀物放射性, 数据经计算机处理, 获得测定值。

5. 统计学分析: 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 进行方差分析, 两两比较行  $q$  检验。

**结 果**

1. 形态学观察: HK 接种后约 5 d, 可达 70% ~ 80% 融合, 1 周左右融合成片。HK-ADM 组培养后 24 h, 镜下可见 HK 黏附于 ADM 表面并形成细胞集落, 周围有细胞核淡染的新生 HK; 培养后 1 周, 组

织切片可见 ADM 表面存在连续的单层细胞条带。HF-ADM 组与 HK 相比, 贴壁时间短, 生长增殖较快; 培养后 1 周, HF 形成密集的细胞膜片, ADM 基质内亦可见少量 HF 侵入生长。

2. 上清中 IL-6、IL-8、TGF- $\beta_1$  的含量: HK-ADM 组与 HK 组或 ADM-HF 组与 HF 组相比, 上清中上述各指标的含量差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。培养 7 d 与 3 d 时相比, 各皮肤替代物上清中 IL-6 和 IL-8 的含量均明显上升( $P < 0.01$ ), 见表 1。TGF- $\beta_1$  的表达无明显变化, 维持在  $(1.025 \pm 0.034) \sim (1.142 \pm 0.004)$  pg/ml。

3. 培养上清中 I、III 型胶原、层粘连蛋白、透明质酸含量的测定: HK 和 HF 均分泌层粘连蛋白、透明质酸和 III 型胶原, HF 为其主要来源。HK-ADM 组与 HK 组或 ADM-HF 组与 HF 组相比, 培养上清中上述指标的含量差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。各皮肤替代物培养 7 d 与 3 d 时相比, 其上清中上述指标的含量均明显上升( $P < 0.01$ )。HK-ADM-HF 组与 ADM-HF 组相比, 上清中 I、III 型胶原含量明显减少( $P < 0.01$ ), 见表 2。

**讨 论**

客观地评价皮肤替代物的生物学活性, 对指导其体外构建、保证移植成功有重要意义。目前最常用的研究方法是对体外培养的皮肤替代物进行组织

表 1 各皮肤替代物培养上清中 IL-6、IL-8 含量的变化 (pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 The changes in the content of IL-6 and IL-8 in the cultured supernatant of the skin substitute (pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-6		IL-8	
	培养 3 d	培养 7 d	培养 3 d	培养 7 d
HK	19.3 ± 4.2	41.3 ± 7.7	212.7 ± 12.9	264.2 ± 18.7
HK-ADM	21.3 ± 5.7	38.2 ± 8.6**	198.1 ± 15.3	249.9 ± 14.2**
HF	341.2 ± 21.7	399.7 ± 27.3	195.7 ± 11.6	272.3 ± 13.8
ADM-HF	328.5 ± 20.1	393.2 ± 19.4**	203.4 ± 13.5	260.3 ± 17.9**
HK-ADM-HF	413.2 ± 21.7	480.6 ± 29.7**	227.3 ± 21.8	271.4 ± 20.3**

注: 各组标本数为 7; 与培养 3 d 比较, \*\*  $P < 0.01$

表 2 皮肤替代物培养上清中层粘连蛋白、透明质酸和 I、III 型胶原表达的变化 (ng/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 The changes in the laminin and hyaluronic acid in the cultured supernatant of the skin substitute (ng/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	层粘连蛋白		透明质酸		I 型胶原		III 型胶原	
	培养 3 d	培养 7 d	培养 3 d	培养 7 d	培养 3 d	培养 7 d	培养 3 d	培养 7 d
HK	16.9 ± 3.6	25.3 ± 10.6	749.0 ± 45.8	888.6 ± 65.7	-	-	47.1 ± 12.6	62.9 ± 23.9
HK-ADM	12.9 ± 4.6	23.5 ± 4.7**	722.5 ± 76.6	808.5 ± 85.2**	-	-	46.8 ± 14.7	63.1 ± 18.4**
HF	45.6 ± 10.4	55.1 ± 9.8	998.1 ± 97.4	1 230.5 ± 93.2	294.3 ± 35.1	325.9 ± 30.2	208.4 ± 34.6	255.8 ± 35.1
ADM-HF	45.7 ± 8.0	57.3 ± 11.2**	1 006.2 ± 85.6	1 230.5 ± 93.2**	284.6 ± 23.7	329.3 ± 28.6**	225.6 ± 22.5	283.9 ± 26.4**
HK-ADM-HF	52.1 ± 9.6	68.9 ± 8.8**	1 104.8 ± 97.5	1 357.9 ± 150.9**	104.3 ± 13.6	155.9 ± 28.7****	126.9 ± 24.7**	171.1 ± 29.2****

注: 各组标本数为 7; 与培养 3 d 比较, \*\*  $P < 0.01$ ; 与 ADM-HF 组比较, ++  $P < 0.01$

切片及扫描电镜观察,判断种植的表皮细胞和成纤维细胞在真皮支架上的生长状况。但关于皮肤替代物分泌的对创面修复具有重要作用的各种活性肽及细胞外基质成分,尚未见系统研究报道。本实验动态观察了以 ADM 为载体构建的多种皮肤替代物在体外培养条件下表达活性物质的情况。结果显示,种植 HK 及(或)HF 的皮肤替代物均能表达 IL-6、IL-8、TGF- $\beta_1$ 、层粘连蛋白、透明质酸及 I、III 型胶原,且随培养时间延长,其分泌量增多(TGF- $\beta_1$  除外);皮肤替代物与单纯培养的 HK 或 HF 相比,各种成分的表达量无明显差异。已有研究证明,高增殖活性的表皮细胞比静止分化的细胞更能产生各种活性肽<sup>[4]</sup>。本实验结果表明,真皮支架对细胞无明显毒性作用,接种的表皮细胞和成纤维细胞具有较强的生物学活性和继续增殖的能力。

IL-6 是表皮细胞的一种丝裂原,可加速创面表皮化,IL-8 作为一种炎性细胞因子,也可促进表皮细胞生长增殖,同时促进创面血管化。TGF- $\beta_1$  在体内可刺激血管内皮细胞、成纤维细胞增殖,加速肉芽组织形成,促进表皮细胞迁移。层粘连蛋白、透明质酸作为真皮结构的重要组成部分,对表皮细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞的黏附、迁移和生长也具有重要作用。这些活性物质的分泌不但反应皮肤替代物具有良好的生物学活性,而且可能有提高其移植存活率的作用。

胶原的合成、分泌和沉积是创面修复的必备条件,成纤维细胞是胶原合成与降解的主要效应细胞。皮肤中 I、III 型胶原比例越小,则形成瘢痕越轻<sup>[5]</sup>。本实验观察到,成纤维细胞分泌的胶原明显高于表皮细胞,而当在皮肤替代物中引入表皮细胞后,成纤维细胞分泌的胶原量明显下降,其中 I 型胶原分泌量下降最明显。已有文献报道,表皮细胞培养上清可刺激成纤维细胞生长增殖,但抑制胶原合成,这种作用不需两者直接接触<sup>[6]</sup>。表明表皮细胞对成纤维细胞的生物学活性具有一定的调节作用,对防止皮肤替代物移植后瘢痕形成具有重要意义。

参 考 文 献

- 1 Brychta P, Adler J, Horky D, et al. Use of skin substitutes in treatment of large hypertrophic scars due to burn injury. *Rozhl Chir*, 2000, 79:27-32.
- 2 肖仕初,夏照帆,杨琪,等.含表皮细胞和成纤维细胞的复合皮构建及移植实验. *中华外科杂志*, 2002, 40:531-533.
- 3 肖仕初,夏照帆,杨琪,等.成纤维细胞一无细胞真皮替代物的生物学活性及移植试验. *中华烧伤杂志*, 2001, 7: 231-233.
- 4 Compton CC, Hickerson W, Nadire K, et al. Acceleration of skin regeneration from cultured epithelial autografts by transplantation to homograft dermis. *J Burn Care Rehabil*, 1993, 14:653-662.
- 5 Merkel JR, Dipalol BR, Hallock M, et al. Typeland type III collagen content of healong wounds in fetal and adults rats. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1988, 187:493-497.
- 6 Garner WL. Epldermal regulation of dermal fibroblast activity. *Plast Reconstr Surg*, 1998, 102: 135-139.

(收稿日期:2003-07-07)  
(本文编辑:莫 愚 罗 勤)

· 消息 ·

《中华烧伤杂志》征订启事

《中华烧伤杂志》是中华医学会主办的高级专业学术期刊,读者对象为医学院校、科研机构各级从事烧伤救治的医生,以及与烧伤防治研究相关学科的人员。烧伤及其并发症几乎涉及医学科学所有边缘学科,与病理生理学、病理学、免疫学、微生物学、分子生物学、生物工程学均有密切关系。临床面临的休克、感染、营养、内脏并发症、水、电解质紊乱及创面修复等难题都很突出。本刊将择优刊登上述外科基本问题以飨读者,为读者提供烧伤及相关学科的新理论、新技术、新方法、新经验。《中华烧伤杂志》由国内著名烧伤外科及相关学科专家组成编委会,杂志具有科学性、实用性,内容新颖,可读性强,是目前国内惟一的全国性烧伤学术界权威刊物。本刊为双月刊,大 16 开,64 页亚光铜印刷并配彩图,每期 10 元。邮发代号:78-131。欢迎广大作者和读者通过邮局订阅或直接向编辑部邮购。汇款请寄:重庆市西南医院《中华烧伤杂志》编辑部,邮编:400038,电话:023-68754670、65460278,传真:023-65460398, E-mail:cmashz@public.cta.cq.cn 或 cmashz@mail.tmmu.com.cn。

欢迎订阅《中国药理学通报》

《中国药理学通报》是国家级核心期刊和权威的文献源期刊,主要刊登药理学研究论文,多次荣获国家及华东地区优秀科技期刊奖,2003 年更是荣获国家期刊奖百种重点期刊奖;被国家权威机构认定为医学类、药学类核心期刊,并被所有国内相关检索性期刊及数十种国外著名检索期刊收录、利用。连续 8 年名列美国《CA 千种表》,1997 年摘引量曾名列美国《CA 千种表》收录的中国医药期刊第 1 名。

《中国药理学通报》为月刊,大 16 开,120 页,印刷质量高,每期定价 12.00 元,全年 144.00 元。邮发代号:26-52,请及时向当地邮局订阅,漏订读者请直接汇款至本刊编辑部,免收邮寄费。地址:安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部,邮编:230032,联系人:吴慧、武明静。电话:0551-5161221,电子信箱:epb@ahmu.edu.cn。